

M.H
4

PCT/JP99/04622

日本特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 18 OCT 1999 27.08.99

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 8月28日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第242660号

出願人
Applicant(s):

伊東 恭悟
住友製薬株式会社

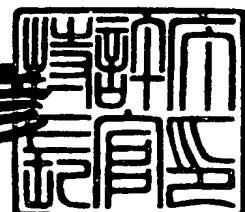
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3065810

【書類名】 特許願
【整理番号】 132528
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/12
C07K 7/00
【発明の名称】 新規な腫瘍抗原タンパク質SART-3、およびその腫瘍抗原ペプチド
【請求項の数】 20
【発明者】
【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9
【氏名】 伊東 恭悟
【発明者】
【住所又は居所】 福岡県大川市大字大橋277-1
【氏名】 中尾 真修
【特許出願人】
【識別番号】 596094371
【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9
【氏名又は名称】 伊東 恭悟
【特許出願人】
【識別番号】 000183370
【氏名又は名称】 住友製薬株式会社
【代表者】 横塚 實亮
【代理人】
【識別番号】 100107629
【弁理士】
【氏名又は名称】 中村 敏夫
【電話番号】 06-466-5214
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な腫瘍抗原タンパク質 S A R T - 3 、およびその腫瘍抗原ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質は、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）。

【請求項2】 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA、又はそのDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズする変異DNA（ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）。

【請求項3】 請求項1または2記載のDNAを有する発現プラスミド。

【請求項4】 請求項3記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体。

【請求項5】 請求項4記載の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法。

【請求項6】 請求項1または2記載のDNAを発現して生産される腫瘍抗原タンパク質。

【請求項7】 請求項1または2記載のDNA、あるいは請求項6記載のタンパク質を有効成分として含有する医薬。

【請求項8】 請求項1または2記載のDNA、あるいは請求項6記載のタンパク質を有効成分として含有する、腫瘍の治療剤または予防剤。

【請求項9】 請求項6記載のタンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

【請求項10】 HLA抗原がHLA-A24である請求項9記載の腫瘍抗

原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

【請求項11】 配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、請求項10記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

【請求項12】 配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む、請求項11記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

【請求項13】 配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む、請求項12記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

【請求項14】 配列番号：25～配列番号：31のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む、請求項13記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。

【請求項15】 請求項9～14いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤または予防剤。

【請求項16】 請求項6記載のタンパク質、請求項9～14いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、のいずれかに特異的に結合する抗体。

【請求項17】 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と請求項9～14いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞。

【請求項18】 請求項17記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

【請求項19】 HLA抗原と請求項9～14いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞。

【請求項20】 請求項19記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドに関する。さらに詳しくは、本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドまたはこれらの誘導体を、*in vivo*または*in vitro*で利用した腫瘍の治療剤または予防剤などに関する。

【0002】

【従来の技術】

生体による腫瘍の排除には、免疫系、特にT細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示すリンパ球の浸潤が認められ (Arch.Surg., 126:200, 1990)、メラノーマからは自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性T細胞 (CTL) が比較的容易に分離されている (Immunol.Today, 8:385, 1987, J.Immunol., 138:989, 1987, Int.J.Cancer, 52:52, 1992等)。また、該CTLの移入によるメラノーマ治療の臨床結果からも、腫瘍排除におけるT細胞の重要性が示唆されている (J.Natl.Cancer.Inst., 86:1159, 1994)。

【0003】

自己の腫瘍細胞を攻撃するCTLが標的とする分子については長い間不明であったが、最近の免疫学および分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。すなわちCTLは、T細胞受容体 (TCR) を用いて、腫瘍抗原ペプチドと呼ばれるペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラスI抗原 (MHCクラスI抗原、ヒトの場合はHLA抗原と呼ばれる)との複合体を認識することにより、自己の腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

【0004】

腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアソームにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でMHCクラスI抗原 (HLA抗原) と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞傷害作用やり

ンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌ワクチンとして利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的CTLを増強させる治療法が可能となった。

【0005】

腫瘍抗原タンパク質としては、1991年にT.Boonらが初めてMAGEと名付けたタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定した (Science, 254:1643, 1991)。その後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質が、主にメラノーマ細胞から同定されている。メラノーマ抗原としては、メラノサイト組織特異的タンパク質である gp 100 (J.Exp.Med., 179:1005, 1994)、MART-1 (Proc.Natl.Acad.Sci.U SA, 91:3515, 1994)、チロシナーゼ (J.Exp.Med., 178:489, 1993) などのメラノソームタンパク質、メラノーマだけでなく各種癌細胞と正常精巣細胞に発現するMAGE関連タンパク質群 (J.Exp.Med., 179:921, 1994)、腫瘍特異的なアミノ酸変異を持つβ-カテニン (J.Exp.Med., 183:1185, 1996)、CDK4 (Science, 269 : 1281, 1995) などが同定されている。また、メラノーマ以外の腫瘍抗原タンパク質としては、HER2/neu (J.Exp.Med., 181:2109, 1995)、p 53 (変異型) (Proc.Natl.Acad.Sci.U SA, 93:14704, 1996) などの癌遺伝子産物、CEA (J.Natl.Cancer.Inst., 87:982, 1995)、PSA (J.Natl.Cancer.Inst., 89:293, 1997) などの腫瘍マーカー、HPV (J.Immunol., 154:5934, 1995)、EBV (Int.Immunol., 7:653, 1995) などのウイルスタンパク質などが同定されている。これらについては、総説 (Immunol.Today, 18:267, 1997、J.Exp.Med., 183:725, 1996、Curr.Opin.Immunol., 8:628, 1996等) の記述に詳しい。

【0006】

腫瘍抗原タンパク質や腫瘍抗原ペプチドを腫瘍の治療や診断に応用するためには、メラノーマに比べて発生頻度が圧倒的に高い扁平上皮癌（食道癌、肺癌等）などに幅広く適応可能な腫瘍抗原の同定が重要である。これに関して、本発明者らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞から腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行い、HLAの型がHLA-A24あるいはHLA-A26であるHLA抗原に結合し

て提示されるいくつかの腫瘍抗原ペプチドを、メラノーマ以外の腫瘍細胞から初めて同定した (J.Exp.Med., 187:277, 1998、国際公開第97/46676号パンフレット)。

【0007】

これらの腫瘍抗原ペプチドを実際に臨床に適用する際には、1種のみならず、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを使用することが望ましい。すなわち、全ての癌細胞が共通に同一の腫瘍抗原を発現しているとは限らず、また、一つの癌細胞上に2種以上の異なる腫瘍抗原ペプチドが提示されていることを考慮すると、複数の異なる腫瘍抗原ペプチドを用いた治療がより効果的であると考えられる。事実、メラノーマにおいては、単一の腫瘍抗原由来のペプチドのみでは効果が不十分であったことから、複数のペプチドのカクテル製剤の開発が試みられている (Int.J.Cancer, 66:162, 1996、Int.J.Cancer, 67:54, 1996)。このような背景から、発生頻度の高い扁平上皮癌等に幅広く適用可能な、新たな腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドの同定が望まれている状況にある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドを提供することを目的とする。すなわち本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドまたはこれらの誘導体を、*in vivo*または*in vitro*で利用した腫瘍の治療剤または予防剤などを提供することを目的とする。本発明の腫瘍抗原ペプチドは、日本人の約60%が保有しているHLA抗原であるHLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドを含むものであることから、多くの患者に適用可能であり、さらに、ヒトの癌でもっとも多く認められる扁平上皮癌等に応用できるものであるため、新規な抗腫瘍剤としての有用性が期待される。ちなみに扁平上皮癌のうち食道癌や肺癌での扁平上皮癌は、現在の化学療養や放射線療法に比較的抵抗性を示すことが知られている。その点からも、本発明の腫瘍抗原ペプチドの開発が期待される。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、新規な腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドを得るために、以下の試みを行った。

まず本発明者らは、食道癌細胞株KE-4 (FERM BP-5955) 由来のcDNAライブラリーを作製し、該ライブラリーの組換えプラスミドとHLA-A2402(HLA-A24の一種)cDNAの組換えプラスミドを纖維芽細胞株VA-13細胞(理化学研究所細胞開発銀行)にダブルトランスフェクトし、そのトランスフェクタントに対し、KE-4に対するCTLであるKE-4CTL (FERM BP-5954) を作用させ、KE-4CTLが活性化されるか否かをIFN- γ の産生量で測定するというスクリーニングを繰り返した。その結果、最終的に、1種の腫瘍抗原タンパク質の遺伝子のクローニングに成功した。本発明者らは、該遺伝子によりコードされる腫瘍抗原タンパク質を“SART-3”と命名した。このSART-3の塩基配列を既知の配列と比較したところ、該SART-3の塩基配列は、GenBank Accession No. D63879として登録されている機能不明の遺伝子KIAA0156と、1塩基異なるものであった。

【0010】

本発明者らはさらに、SART-3のアミノ酸配列中、HLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチド部分を同定し、これらのペプチドに腫瘍抗原ペプチドとしての活性の存することを明らかにした。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0011】

すなわち本発明の要旨は、

- (1) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する変異タンパク質、をコードするDNA(ただし、該タンパク質および変異タンパク質は、HLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである)、
- (2) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA、又はそのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA(ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、HLA抗原と結合して細胞傷

- 害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである)、
- (3) 前記(1)または(2)記載のDNAを有する発現プラスミド、
 - (4) 前記(3)記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体、
 - (5) 前記(4)記載の形質転換体を培養し、発現される組換えタンパク質を回収することからなる、組換えタンパク質の生産方法、
 - (6) 前記(1)または(2)記載のDNAを発現して生産される腫瘍抗原タンパク質、
 - (7) 前記(1)または(2)記載のDNA、あるいは前記(6)記載のタンパク質を有効成分として含有する医薬、
 - (8) 前記(1)または(2)記載のDNA、あるいは前記(6)記載のタンパク質を有効成分として含有する、腫瘍の治療剤または予防剤、
 - (9) 前記(6)記載のタンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、
 - (10) HLA抗原がHLA-A24である前記(9)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、
 - (11) 配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む配列より選択される、前記(10)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、
 - (12) 配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む、前記(11)記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、
 - (13) 配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部または一部を含む、前記(12)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、
 - (14) 配列番号：25～配列番号：31のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含む、前記(13)記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体、
 - (15) 前記(9)～(14)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体から選択される少なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療

剤または予防剤、

(16) 前記(6)記載のタンパク質、前記(9)～(14)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、のいずれかに特異的に結合する抗体、

(17) 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA抗原と前記(9)～(14)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞、

(18) 前記(17)記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤、

(19) HLA抗原と前記(9)～(14)いずれか記載の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞、ならびに

(20) 前記(19)記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤、に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明のDNAは、新規な腫瘍抗原タンパク質をコードするものであり、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するSART-3タンパク質、又は該SART-3のアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質は、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）、あるいは、配列番号：2に記載の塩基配列からなるSART-3のDNA、又は該SART-3のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズする変異DNA（ただし、該DNAおよび変異DNAが発現して生産されるタンパク質は、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるものである）が例示される。以下、これら本発明のDNAにつき順次説明する。

【0013】

1) SART-3をコードするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA」、「配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA」とは

、本発明の腫瘍抗原タンパク質SART-3をコードするDNAである。該DNAは、実施例に記載の方法によりクローニングすることができる。また、GenBank Accession No. D63879において開示されている塩基配列、あるいは本明細書の配列表の配列番号：2に開示されている塩基配列の適当な部分をハイブリダイゼーションのプローブあるいはPCRのプライマーに用いて、例えば食道癌細胞株KE-4 (FERM BP-5955) 由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても、クローニングすることができる。該クローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

【0014】

2) SART-3の改変タンパク質またはアレル変異体等をコードするDNA

前記DNAのうち、「SART-3のアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する変異タンパク質をコードするDNA」とは、人為的に作製したいわゆる改変タンパク質や、生体内に存在するアレル変異対等のタンパク質をコードするDNAを意味し、この変異タンパク質をコードするDNAは、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1-3巻, Cold Spring Harber Laboratory Press (1989)に記載の種々の方法、例えば部位特異的変異誘発やPCR法等によって製造することができる。なお、ここで置換、欠失及び／又は付加されるアミノ酸残基の数は、上記部位特異的変異誘発等の周知の方法により置換、欠失及び／又は付加できる程度の数を指す。

【0015】

3) SART-3のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

前記DNAのうち、「SART-3のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする変異DNA」とは、例えばラット、マウス等の脊椎動物全てのSART-3のcDNAのような、配列番号：2に記載の塩基配列からなるヒトSART-3のcDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを指す。

【0016】

ここで「ストリンジエントな条件」とは、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ ($20 \times \text{SSC}$ は、 333mM Sodium citrate, 333mM NaClを示す)、 0.5% SDSおよび 50% ホルムアミドを含む溶液中で 42°C にてハイブリダイズさせた後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 0.5% SDSの溶液中で 68°C にて洗浄するような条件、あるいは、中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p.148-151、秀潤社、1995年、に記載の条件等を指す。

【0017】

これら変異DNAは、例えば配列番号：2に記載のDNAとのハイブリダイゼーションなどによりクローニングされるものであるが、具体的なcDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、ポジティブコロニーの選択、塩基配列の決定等の操作はいずれも公知であり、先のMolecular Cloning等を参照して行うことができる。ハイブリダイゼーションに用いるプローブとしては、例えば配列番号：2に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

【0018】

以上1)～3)に挙げたDNAのうち、「そのDNAが発現して生産されるタンパク質が、細胞内分解により、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じる」という特性を有するものが、本発明の腫瘍抗原タンパク質をコードするDNA、すなわち本発明のDNAとなり得る。すなわち、該DNAが発現して生産されるタンパク質の一部のアミノ酸配列からなる部分ペプチドがHLA抗原と結合可能であり、HLA抗原と結合して細胞表面に提示された場合、そのペプチド断片とHLA抗原との複合体に対して特異的なCTLが結合して細胞傷害作用やサイトカインの産生が誘導される、そのようなペプチド断片を生じるものが、本発明のDNAとなり得る。

【0019】

ここで、候補となるDNAが腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAとなり得るか否かは、例えば以下のような方法により測定することができる。

すなわち、纖維芽細胞VA-13（理化学研究所細胞開発銀行）やアフリカミドリザル腎臓由来のCOS-7（ATCC CRL1651）に対し、候補となるDNAを有する発現

プラスミドと、HLA抗原をコードするDNAを有する発現プラスミドとをダブルトランスフェクトした後、用いたHLA抗原に拘束性の腫瘍反応性のCTLを作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を測定することによって調べることができる。なお、SART-3はHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドを有するものであるため、前記HLA抗原をコードするDNAとしてはHLA-A24のcDNA (Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)) が挙げられ、前記CTLとしては、KE-4CTL (FERM BP-5954) などのHLA-A24拘束性のCTLが挙げられる。

【0020】

以上のような本発明のDNAは、医薬の有効成分とすることができる。即ち、本発明のDNAを有効成分として含有する「医薬」は、例えば、本発明のDNAを腫瘍患者に投与することで、腫瘍を治療または予防することができる。

【0021】

本発明のDNAを投与すると細胞内で腫瘍抗原タンパク質が高発現し、腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して、細胞表面に高密度に提示されることにより、腫瘍特異的CTLが体内で効率的に増殖することになり、これにより腫瘍の治療または予防が達成される。本発明のDNAを投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊、12(15), (1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

【0022】

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法

、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

【0023】

本発明のDNAを実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するin vivo法、およびヒトからある種の細胞を採取し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻すex vivo法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）。in vivo法がより好ましい。

【0024】

in vivo法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。in vivo法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のDNAを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のDNAを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（H V J）—リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができます。

製剤中の本発明のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明のDNAを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0025】

本発明においてタンパク質とは、上記した本発明の種々のDNAによりコードされるタンパク質であり、その細胞内分解により、HLA抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるという、腫瘍抗原タンパク質としての特性を有するものを指す。具体例としては、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するSART-3が挙げられる。これら本発明のタンパク質は、上記本発明のDNAを用いることにより、大量に製造することが可能である。

【0026】

本発明のDNAを発現して腫瘍抗原タンパク質を生産するには、例えば、前述

のMolecular Cloning 等の多くの成書や文献に基づいて実施することができる。すなわち、本発明のDNAを適当な発現ベクター（例えばpSV-SPORT1、pCR3など）に組み込むことにより、宿主細胞内で複製し、機能する発現プラスミドを作製する。次に発現プラスミドを適当な宿主細胞に導入して形質転換体を得る。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、また動物などの多細胞真核生物の細胞などが挙げられる。また、宿主細胞への遺伝子導入法としては、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、電気パルス法、リポフェクチン法などがある。形質転換体は、適当な培地で培養することによって目的とするタンパク質を生産する。以上のようにして得られた腫瘍抗原タンパク質は、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

【0027】

以上のような本発明のタンパク質もまた、医薬の有効成分とすることができます。即ち、本発明のタンパク質を有効成分として含有する「医薬」は、例えば、本発明のタンパク質を腫瘍患者に投与することで、腫瘍を治療または予防することができる。

本発明の腫瘍抗原タンパク質を有効成分として含有する医薬は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994)に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直徑数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原タンパク質の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0028】

本発明において腫瘍抗原ペプチドとは、本発明の腫瘍抗原タンパク質の一部よりなる部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され

得る腫瘍抗原ペプチドである。すなわち、前記した本発明の腫瘍抗原タンパク質のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドであって、かつ、該ペプチドとHLA抗原との結合複合体がCTLにより認識され得るようなペプチドであれば全て、本発明の腫瘍抗原ペプチドの範疇に含まれる。このような本発明の腫瘍抗原ペプチドは、本発明の腫瘍抗原タンパク質の一部よりなる候補ペプチドを合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

【0029】

ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては文献（ペプタイド・シンセシス（Peptide Synthesis）, Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ（The Proteins）, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善（株）, 1975; ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）, 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991）などに記載されている方法が挙げられる。

【0030】

次に、本発明の腫瘍抗原ペプチドの同定方法につき、以下に記述する。

HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している（例えばImmunogenetics, 41:p178, 1995などを参照のこと）。例えばHLA-A24のモチーフとしては、8~11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンあるいはメチオニンとなることが知られている（J.Immunol., 152, p3913, 1994）。またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995、J.Immunol., 155: p4749, 1995）。

【0031】

【表1】

HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L

(ペプチドの長さは8~11アミノ酸)

【0032】

ペプチドの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により（Immunogenetics, 41:178, 1995）、通常8から14アミノ酸程度であることが明らかにされている（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの抗原ペプチドも認められる）。

【0033】

これらのモチーフを有するペプチド部分を本発明の腫瘍抗原タンパク質のアミノ酸配列中から選び出すのは容易である。例えば、腫瘍抗原タンパク質SART-3のアミノ酸配列（配列番号：1）を見れば、上記モチーフ構造を有する部分を容易に選び出すことができる。選び出された候補ペプチドを前述の方法にて合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを測定することにより、本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

【0034】

本発明の腫瘍抗原ペプチドの具体的な同定法としては、例えばJ.Immunol., 154, p2257, 1995に記載の方法が挙げられる。すなわち、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原が陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、in vitroで該候補ペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスしたHLA抗原陽性細胞を特異的に認識するCTLが誘導された場合は、該候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドに成り得ることが示される。ここでCTLの誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン（例え

ばIFN- γ ）の量を測定することによって調べることができる。また ^{51}Cr で標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法（ ^{51}Cr リリースアッセイ、Int.J.Cancer,58:p317,1994）によっても調べることができる。

さらに、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原のcDNAを発現する発現プラスミドを、例えばCOS-7細胞(ATCC No.CRL1651)やVA-13細胞(理化学研究所細胞銀行)に導入した細胞に対して候補ペプチドをパルスし、この細胞に対して、前記候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原に拘束性のCTLを反応させ、該CTLが産生する種々のサイトカイン(例えばIFN- γ)の量を測定することによっても、調べることができる(J.Exp.Med.,187: 277,1998)。

【0035】

以上のような腫瘍抗原ペプチドの配列の規則性(モチーフ)が判明している場合と異なり、例えばHLA-A26のようにそのペプチドのモチーフが明らかでない場合は、該HLA-A26と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識するCTL株が存在する場合には、例えばW097/46676に記載の方法に準じて本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

なお、以上述べたような腫瘍抗原ペプチドの同定法を、以下、“腫瘍抗原ペプチドのアッセイ法”と総称することもある。

【0036】

前記したように、HLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチドの配列には規則性(モチーフ)があり、具体的には、8~11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンあるいはメチオニンとなることが知られている(J.Immuno.,152,p3913,1994)。従って、本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドとしては、配列番号：1に記載のSART-3のアミノ酸配列上、このようなモチーフ構造を有する部分ペプチドであって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。

【0037】

例えば配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含むペプチドであって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが例示される。すなわち、

1) 配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、

2) 配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列を含み該アミノ酸配列より長いペプチド、または配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の一部よりなるペプチド、

であって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、HLA-A24抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度のものが挙げられる。

【0038】

本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドの好適なものとしては、配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。すなわち、

1) 配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列よりなるペプチド、

2) 配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列を含み該アミノ酸配列より長いペプチド、または配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の一部よりなるペプチド、であって、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るような腫瘍抗原ペプチド、

が挙げられる。ここで、前記2)のペプチドの長さとしては、HLA-A24抗原に結合して提示されるという観点から、8～11アミノ酸程度のものが挙げられる。

【0039】

本発明において「腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の特性を有する誘導体」（以下、腫瘍抗原ペプチド誘導体と略す場合がある）とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列の1または数個のアミノ酸残基を改変した改変体であって、

かつHLA抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての特性を有するものを指す。このような本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、本発明の腫瘍抗原ペプチドの一部を改変した改変体を前記ペプチド合成法に基づき合成し、これを前記腫瘍抗原ペプチドのアッセイ法に供することにより、同定することができる。

【0040】

先に記載したように、HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している。従って、該モチーフに基づき、本発明の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸を改変した腫瘍抗原ペプチド誘導体を作製することが可能である。

【0041】

例えばHLA-A24に結合して提示される抗原ペプチドのモチーフとしては、前記したように、8~11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンあるいはメチオニンであることが知られている（J. Immunol., 152:p3913, 1994）。またHLA-A2の場合は、前記の表1に記載のモチーフが知られている。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の例として、これらモチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置（HLA-A24、HLA-A2においては第2位とC末端）にあるアミノ酸を他のアミノ酸に置換したものが、好ましくは、該位置において、前記モチーフ上置換が可能なアミノ酸の中から置換するアミノ酸を選択した腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。

【0042】

ここで、HLA-A24に拘束性の腫瘍抗原ペプチドの誘導体としては、例えばSART-3のアミノ酸配列上HLA-A24の結合モチーフを有するペプチドに対して、前記モチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置、すなわち第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む

腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられ、好ましくは、第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を前記モチーフ上置換が可能なアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。

【0043】

例えば配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示され、特に、配列番号：3～配列番号：24のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位をチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファンに置換し、および／またはC末端をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンあるいはメチオニンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が例示される。

【0044】

本発明のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体の好適なものとしては、配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位および／またはC末端のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられ、好ましくは、配列番号：3～配列番号：9のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位をチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファンに置換し、および／またはC末端をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンあるいはメチオニンに置換したアミノ酸配列の全部または一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。このような腫瘍抗原ペプチド誘導体の例を、配列番号：25～配列番号：31に示す。

【0045】

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体は、少なくとも1種または2種以上組み合わせることにより、腫瘍の治療剤または予防剤として使用することができる。すなわち本発明は、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分として含有する腫瘍の治療剤または予防剤をも提供するものである。本発明の腫瘍の治療剤または予防剤をSART-3陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHL

A抗原に腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体が提示され、提示されたHLA抗原複合体特異的CTLが増殖して腫瘍細胞を破壊することができ、従って、腫瘍の治療または予防が可能となる。SART-3は、食道癌等の扁平上皮癌等に広範に発現しているので、本発明の腫瘍の治療剤または予防剤は、適用範囲の広いことが有利である。さらに、前記扁平上皮癌は、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが多いが、本発明の腫瘍の治療剤を併用することにより、治療効果を上げることが可能となる。

【0046】

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を有効成分とする腫瘍の治療剤または予防剤は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0047】

本発明は、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体に特異的に結合する抗体をも提供するものである。該抗体は、例えば、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. ら編, Cold Spring Harber Laboratory Press 出版 New York 1989などに記載の方法により容易に作製される。すなわち、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を用いて常法により適宜動物を免疫することにより、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティクロマトグラフイー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノプロット法、放射免疫測定法 (RIA) 、酵素免疫測定法 (ELISA) 、蛍光あるいは発光測定

法等より適宜選択できる。

【0048】

本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子は、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することが可能である。

すなわち、腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子を腫瘍の治療に用いる場合、患者の体内で効率良く特異的なC T Lを誘導することの可能な投与法が重要になる。そのための手段のひとつとして、本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、H L A抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を提示させた抗原提示細胞、および該抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を提供するものである。

【0049】

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体を提示することの可能なH L A抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

本発明の抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質そのものを体外でパルスしてH L A抗原と前記ペプチドまたはその誘導体との複合体を作製することにより得られる(Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998)。また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチドをコードする遺伝子を導入することによっても、最終的にH L A抗原と前記ペプチドまたはその誘導体との複合体を作製することができる。

【0050】

前記抗原提示細胞を有効成分として含有する腫瘍の治療剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(P B S)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、S A R T - 3陽性の患者の体内で効率良く特

異的なCTLが誘導され、腫瘍を治療することができる。なお、HLA-A24に陽性の腫瘍患者に対してはHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドあるいはその誘導体を使用するといった、患者と使用するペプチドとでHLAの型を合わせる必要のあることは言うまでもない。

【0051】

さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子のイン・ビトロでの利用法として、以下の養子免疫療法における利用が挙げられる。

すなわちメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている (J.Natl.Cancer.Inst., 86:1159, 1994)。またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている (J.Exp.Med., 185:453, 1997)。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体、あるいは腫瘍抗原タンパク質またはその遺伝子を用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

【0052】

すなわち本発明は、前記HLA抗原と本発明の腫瘍抗原ペプチドまたはその誘導体との複合体を特異的に認識するCTL、および、該CTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤をも提供するものである。該治療剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このようなCTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を患者の体内に戻すことにより、SART-3陽性の患者の体内でCTLによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療することができる。

【0053】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0054】

参考例1

食道癌細胞株に対する細胞傷害性T細胞（CTL）株の樹立

中尾ら著、Cancer Res., 55:4248-4252(1995)の記載に従い、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌細胞株KE-4に対するCTLを患者の末梢血単核球細胞から樹立し、KE-4CTLと命名して以下の実験に使用した。食道癌細胞株KE-4およびKE-4CTLは、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、それぞれ受託番号FERM BP-5955およびFERM BP-5954で寄託されている（寄託日：いずれも平成9年5月23日）。また、前述の中尾らの報告に従い、KE-4のHLAクラスI分子のタイピングを行い、HLA-A2402、-A2601、-B54、-B60、-Cw1、-Cw3であることを確認した。

【0055】

参考例2

HLA-A2402 cDNAの調製

KE-4から、中尾ら著、Cancer Res., 55:4248-4252(1995)の記載に従い、HLA-A2402のcDNAを発現ベクターpCR3(INVITROGEN社製)に組み込んだ組換えプラスミドを作製した。

【0056】

参考例3

KE-4由来cDNAライブラリーの作製

KE-4からmRNA精製システム（ファルマシアバイオテク社製）を用い添付のプロトコールに従い、全RNA画分の分離およびoligo(dT)カラムによるpoly(A)⁺mRNAの調製を行った。mRNAよりスパースクリプトプラスミドシステム(GIBCO BRL社製)を用い添付のプロトコールに従い、両端にNotIアダプターとSalIアダプターを連結したcDNAを作製した後、このcDNAを発現ベクタ

ーのプラスミドpSV-SPORT1(GIBCO BRL社製)の制限酵素NotIおよびSalIの切断部位にライゲーションにより連結して組換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドをジーンパルサー(Bio-Rad社製)を用いて $25\mu F$, $2.5kV$ の条件で、電気パルスにより大腸菌のエレクトロマックス DH10BTMセル(GIBCO BRL社製)に導入し、アンピシリン($50\mu g/ml$)を含むLB培地(1%バクトリプトン、0.5%イーストエキス、0.5%NaCl、pH7.3)で組換プラスミドが導入されている形質転換体を選択した。

【0057】

実施例1

新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子のスクリーニング

参考例3に示した形質転換体の約100個のプールからの組換えプラスミドDNAの回収は以下のように行った。すなわち、アンピシリン($50\mu g/ml$)を含むLB培地の入った96ウェルU底マイクロプレートに、ウェルあたり100個の形質転換体を加え培養後、その一部をウェル当たり $0.25ml$ のTYGPN培地(F.M.Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)の入った別の96ウェルU底マイクロプレートに移して $37^{\circ}C$ で48時間培養し、残りのLB培地のマイクロプレートは凍結保存した。TYGPN培地で培養した形質転換体の組換えプラスミドDNAは、マイクロプレートでアルカリ溶解法(F.M. Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)により調製した。イソプロパノール沈澱で回収した組換えプラスミドDNAは、 $50\mu l$ の $20ng/ml$ RNaseを含む $10mM$ Tris, $1mM$ EDTA, pH7.4溶液で懸濁した。

【0058】

線維芽細胞株のVA-13細胞(理化学研究所細胞開発銀行、Ann.Med.Exp.Biol.Fenn., 44:242-254, 1966)へ、リポフェクチン法により以下のようにKE-4cDNAの組換えプラスミドとHLA-A2402cDNAの組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした。すなわち、VA-13細胞を96ウェル平底マイクロプレートにウェル当たり7000個を加えて、 $100\mu l$ の10%FCSを含むRPMI 1640培養液で2日間培養した。リポフェクチン試薬(GIBCO BRL社製)を用い、形質転換体約100個分のKE-4cDNAの組換えプラスミド $25\mu l$ と参考例2に示したHLA-A2402cDNAの

組換えプラスミド $10\mu l$ (200ng)と約35倍に希釈したリポフェクチン試薬 $35\mu l$ の混合液 $70\mu l$ のうちの $30\mu l$ をVA-13細胞に加えてダブルトランスフェクトした。トランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに $200\mu l$ の10%FCSを含む培養液を加え、更に72時間、 $37^{\circ}C$ で培養した後、培養液を除去し、ウェル当たり10000個のKE-4CTLを加えて $100\mu l$ の10%FCSと $25U/ml$ のIL-2を含む培養液で $37^{\circ}C$ で24時間培養した。培養液を回収し、以下のELISA法にてIFN- γ 量を測定した。

【0059】

すなわち、96ウェルマイクロプレートに固層化抗体として抗ヒトIFN- γ マウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結合をブロックした後、検体中のIFN- γ を抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒトIFN- γ ウサギポリクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体を結合した後、発色基質としてパラニトロフェニルfosfateを反応させ、1N NaOHを等量加えて反応を停止させた後、吸光度(405nm)を測定した。これをスタンダードのIFN- γ で得られた値と比較することにより定量した。

【0060】

高いIFN- γ 産生が認められた群については、該当する凍結保存してあったKE-4cDNAの組み換えプラスミドによる形質転換体約100個のプールを用いてさらに以下のようにスクリーニングを行った。すなわち、形質転換体のプールをアンピシリン($50\mu g/ml$)を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得て、各群200コロニーについてウェル当たりの形質転換体が1種類となる条件で上記と同様の方法で培養し、KE-4cDNAの組換えプラスミドDNAを調製した。さらに上記と同様な方法でVA-13細胞へのKE-4cDNAの組換えプラスミドとHLA-A2402cDNAの組換えプラスミドのダブルトランスフェクトを行い、引き続いてKE-4CTLとの混合培養を行い、KE-4CTLが反応して産生した培養液中のIFN- γ の定量を行って陽性のプラスミドを選択した。この操作によりKE-4cDNA組換えプラスミドクローンが選択され、クローン13と命名した。解析の結果、クローン13には、約 $1.2kb$ のcDNAが組み込まれていた。クローン13については、さらに

もう一度、同様な操作を繰り返してKE-4CTLによるIFN- γ の産生量を上記と同様の方法により定量した。その結果を以下の表2に示す。

【0061】

【表2】

標的細胞	KE-4CTLが産生したIFN- γ 量 (pg/ml)
VA-13 + HLA-A2402	326
VA-13 + HLA-A2402 + クローン13	775

【0062】

KE-4CTLは、VA-13にHLA-A2402のみをトランスフェクトした細胞に対してよりも、VA-13にHLA-A2402とクローン13をダブルトランスフェクトした細胞に対して、より強く反応してIFN- γ を産生した。この結果から、クローン13がコードするタンパク質は、腫瘍抗原タンパク質であることが示された。

【0063】

実施例2

腫瘍抗原タンパク質をコードする全長のcDNAクローンのクローニング

実施例1で得られたクローン13に組込まれたcDNAの遺伝子の全長の長さを調べるために、以下のノーザンハイブリダイゼーションを行った。

まず食道癌細胞株KE-4より、RNazol B(TEL-TEST, INC.社製)を用いてRNAを調製した。5 μ gのRNAをホルムアミド、ホルムアルデヒド存在下で変性させ、アガロース電気泳動を行った後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン(Amersham社製)に転写、固定した。マルチプライムDNAラベリングシステム(Amersham社製)により、クローン13の挿入配列部分を³²Pで標識してDNAプローブを作製し、公知の方法(中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p.148-151、秀潤社、1995年)に従って、メンブレン上のRNAにハイブリダイズさせた後、オートラジオグラフィーにより、クローン13に組込まれたcDNAに対応するmRNAを検出した。この結果より、mRNAの全長は約3.8kbであることが明らかになったため、先に得られたクローン13を含む全長のcDNAクローンのクローニングを行った。参考例3に示したKE-4由来cDNAライブラリーをアンピシリン(50 μ g/ml)を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロ

ニーを得た後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン(Amersham社製)に添付のプロトコールに従って、コロニーのDNAを転写、固定した。クローン13の挿入配列部分を³²Pで標識したDNAプローブを用い、上述のノーザンハイブリダイゼーションと同様の条件でハイブリダイゼーションとオートラジオグラフィーを行って、陽性を示す形質転換体のコロニーを選択した。さらに、選択された複数のコロニーより組換えプラスミドを回収し、制限酵素N o t I 及びS a l Iで処理した後、アガロース電気泳動により組み込まれたcDNAの長さを確認した。約3.8kbのcDNAが組み込まれた組換えプラスミドを選択し、これをクローンKと命名した。次に、実施例1と同様な方法により、腫瘍抗原タンパク質遺伝子のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドクローンKと、HLA-A2402のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドとをVA-13細胞にダブルトランスフェクトした細胞を標的細胞として、KE-4CTLが反応して産生したIFN-γ量を定量した。その結果を以下の表3に示す。

【0064】

【表3】

標的細胞	KE-4CTLが産生したIFN-γ量 (pg/ml)
VA-13 + HLA-A2402	342
VA-13 + HLA-A2402 + クローンK	627

【0065】

KE-4CTLは、VA-13にHLA-A2402のみをトランスフェクトした細胞に対してよりも、VA-13にHLA-A2402とクローンKをダブルトランスフェクトした細胞に対して、より強く反応してIFN-γを産生した。この結果から、クローンKがコードするタンパク質は腫瘍抗原タンパク質であることが示された。このクローンKがコードする腫瘍抗原タンパク質を、SART-3 (squamous cell carcinoma antigens recognized by T cells-3) と命名した。

【0066】

実施例3

腫瘍抗原タンパク質遺伝子の塩基配列の決定

実施例2で得られた腫瘍抗原タンパク質SART-3をコードするDNAについて、Dy

dideoxy Terminator Cycle Sequencingキット（パーキンエルマー社製）を使用して、その塩基配列を決定した。決定されたSART-3の塩基配列を、配列表の配列番号：2に示す。該cDNAの全長は3798塩基対であった。配列番号：2によってコードされるSART-3のアミノ酸配列（963アミノ酸）を、配列番号：1に示す。配列番号：2に記載した塩基配列を、GenBankデータベースを使用して既知の配列と比較した結果、腫瘍抗原タンパク質SART-3の塩基配列は、GenBank Accession No. D63879として登録されている機能不明の遺伝子KIAA0156と1塩基（KIAA0156の第119位）異なる配列を有していた。

【0067】

実施例4

候補ペプチドの選択

HLA分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、HLA-A24の場合、8~11アミノ酸よりなるペプチドの第2位がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンあるいはトリプトファン、またC末端がフェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、イソロイシンあるいはメチオニンがモチーフとなることが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995, J.Immunol., 152:3913, 1994, J.Immunol., 155:4307, 1994）。このようなモチーフに従い、配列番号：1に記載の腫瘍抗原タンパク質SART-3のアミノ酸配列から、上記モチーフを有する8~11アミノ酸よりなるペプチド部分を選択することが可能である。HLA-A24の結合モチーフを有するペプチドの例を配列番号：3~配列番号：24に示す。これらのペプチドを(株)バイオロジカに依頼し、Fmoc法にて合成を行った。

【0068】

次にHLA-A2402 cDNAの組換えプラスミドを文献（J.Exp.Med., 187:277, 1998）の記載に従い、 1.8×10^4 個のVA-13細胞にリポフェクチン法にてトランスフェクションしてHLA-A2402を発現させた。この細胞に対し、先に合成したHLA-A24の結合モチーフを有する各種ペプチドをそれぞれ $10 \mu M$ で2時間添加してパルスした後、 2×10^4 個のKE-4CTLとともに18時間培養し、KE-4CTLが產生した培養上清中のIFN- γ 量をELISA法にて測定した。7種のペプチド、すなわち腫瘍抗原タンパ

ク質SART-3のアミノ酸配列の第109位から第118位の配列よりなるペプチド「109-118」（配列番号：3）、第172位から第181位の配列よりなるペプチド「172-181」（配列番号：4）、第284位から第292位の配列よりなるペプチド「284-292」（配列番号：5）、第315位から第323位の配列よりなるペプチド「315-323」（配列番号：6）、第416位から第425位の配列よりなるペプチド「416-425」（配列番号：7）、第426位から第434位の配列よりなるペプチド「426-434」（配列番号：8）、及び第448位から第456位の配列よりなるペプチド「448-456」（配列番号：9）を用いて上記の実験を行った結果を表4に示す。

【0069】

【表4】

ペプチド	上清中のIFN- γ (pg/ml)
「109-118」	928
「172-181」	830
「284-292」	794
「315-323」	880
「416-425」	731
「426-434」	833
「448-456」	754
なし	677

【0070】

KE-4CTLは、ペプチドをパルスしていない細胞に対してよりも、ペプチドをパルスした細胞に対して強く反応してIFN- γ を産生した。この結果から、これら7種のペプチドは腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示された。

【0071】

実施例5

腫瘍抗原ペプチドの合成

前記7種のペプチドについて、以下のように固相法により合成を行った。

【0072】

(1) S A R T - 3 「109-118」 V a l - T y r - A s p - T y r - A s n - C

ys-His-Val-Asp-Leu (配列番号: 3) の合成

樹脂はFmoc-Leu-Alko Resin (0.55mmol/g, 100-200mesh) を用いた。この樹脂100mgを用いて、後記スケジュール1に従って合成を開始し、Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Boc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

【0073】

このペプチド樹脂にReagent K (5%フェノール、5%チオアニソール、5%H₂O、2.5%エタンジチオール/TFA溶液) 2mlを加え、室温で2.5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過しジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム(30φ×250mm)に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を18.0分で25%まで増加させ、流速7ml/min.で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Val-Tyr-Asp-Tyr-Asn-Cys-His-Val-Asp-Leu 31.0mgを得た。

【0074】

得られたVal-Tyr-Asp-Tyr-Asn-Cys-His-Val-Asp-Leuは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6φ×250mm)を用いた、16%から46%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間19.3分を示し、そのアミノ酸分析値(ただし、Cysは検出せず)および質量分析値は理論値と一致した。

【0075】

アミノ酸分析

加水分解: 1% フェノール / 6N 塩酸水溶液、110°C、8時間

分析法: ニンヒドリン法

* 基準アミノ酸 () 内理論値

A s x : 2. 77 (3)

V a l : 1. 70 (2)

* L e u : 1. 00 (1)

T y r : 1. 98 (2)

H i s : 0. 91 (1)

質量分析 (FAB)

 $[M + H]^+$: 1241

【0076】

【表5】

スケジュール1

工程	時間(分) × 処理回数
1. (洗浄) DMF 1. 2 ml	1 × 2
2. (脱保護) 50% ピペリジン / DMF	12 × 1
3. (洗浄) DMF 1. 2 ml	1 × 7
4. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) / NMP 溶液 0. 9 ml、D I C (5当量) / NMP 溶液 0. 3 ml	30 × 1
5. (洗浄) DMF 1. 2 ml	1 × 2
6. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) / NMP 溶液 0. 9 ml、D I C (5当量) / NMP 溶液 0. 3 ml	30 × 1
7. (洗浄) DMF 1. 2 ml	1 × 4

【0077】

(2) S A R T - 3 「172-181」 L e u - P h e - G l u - L y s - A l a - V a l - L y s - A s p - T y r - I l e (配列番号: 4) の合成

前記(1)と同様にして、Fmoc-Ile-Alko Resin (0.4 mmol/g, 100-200 mesh) 100mgを用いて、Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム(30φ×250mm)に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を300分で30%まで増加させ、流速7ml/min.で溶出した。溶出液をA 220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Leu-Phe-Glu-Lys-Ala-Val-Lys-Asp-Tyr-Ile 66.3mgを得た。

【0078】

得られたLeu-Phe-Glu-Lys-Ala-Val-Lys-Asp-Tyr-Ileは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6φ×250mm)を用いた、12%から42%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間23.8分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

【0079】

アミノ酸分析

加水分解: 1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、12時間

分析法: ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

A s x : 0.94 (1)

G l x : 1.03 (1)

A l a : 1.00 (1)

V a l : 0. 88 (1)
 I l e : 0. 92 (1)
 * L e u : 1. 00 (1)
 T y r : 0. 96 (1)
 P h e : 0. 97 (1)
 L y s : 1. 45 (2)

質量分析 (F A B)

 $[M+H]^+$: 1225

【0080】

(3) S A R T - 3 「284-292」 A s n - T y r - A s n - L y s - A l a - L e u - G l n - G l n - L e u (配列番号: 5) の合成

前記(1)と同様にして、Fmoc-Leu-Alko Resin 100 mgを用いて、Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-Asn-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム($30\phi \times 250\text{mm}$)に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を300分で30%まで増加させ、流速 7ml/min で溶出した。溶出液を 220nm でモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、A s n - T y r - A s n - L y s - A l a - L e u - G l n - G l n - L e u 25.0mgを得た。

【0081】

得られたA s n - T y r - A s n - L y s - A l a - L e u - G l n - G l n - L e uは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム($4.6\phi \times 250\text{mm}$)を用いた、12%から42%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間19.0分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

【0082】

アミノ酸分析

加水分解: 1% フェノール / 6N 塩酸水溶液、110°C、12時間

分析法: ニンヒドリン法

* 基準アミノ酸 () 内理論値

A s x : 1. 87 (2)

G l x : 2. 03 (2)

A l a : 0. 98 (1)

* L e u : 2. 00 (2)

T y r : 0. 99 (1)

L y s : 0. 97 (1)

質量分析 (FAB)

 $[M+H]^+$: 1091

【0083】

(4) S A R T - 3 「315-323」 A l a - T y r - I l e - A s p - P h e - G
l u - M e t - L y s - I l e (配列番号: 6) の合成

前記(1)と同様にして、Fmoc-Ile-Alko Resin (0.6
 2mmol/g, 100-200mesh) 100mgを用いて、Fmoc-L
 ys (Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Glu (OtBu)
 -OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp (OtBu)-OH, F
 moc-Ile-OH, Fmoc-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-Ala
 -OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを
 酢酸水に溶解し、予め0.1% TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-P
 ACK ODS-Aカラム (30φ×250mm) に注入し、カラムを0.1%
 TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を180分で40%まで増加させ、流速
 7ml/min. で溶出した。溶出液を220nmでモニターし、目的物を含
 む画分を集め、凍結乾燥し、Ala-Tyr-Ile-Asp-Phe-Glu
 -Met-Lys-Ile 15.4mgを得た。

【0084】

得られたA l a - T y r - I l e - A s p - P h e - G l u - M e t - L y s - I l e は、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6φ×250mm)を用いた、21%から51%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間19.6分を示し、そのアミノ酸分析値(ただし、M e t は検出せず)および質量分析値は理論値と一致した。

【0085】

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール／6N塩酸水溶液、110℃、8時間

分析法：ニンヒドリン法

* 基準アミノ酸 () 内理論値

A s x : 0. 91 (1)

G l x : 1. 06 (1)

A l a : 1. 06 (1)

I l e : 1. 69 (2)

T y r : 0. 81 (1)

* P h e : 1. 00 (1)

L y s : 0. 87 (1)

質量分析(FAB)

[M+H]⁺ : 1130

【0086】

(5) S A R T - 3 「416-425」 A s p - T y r - V a l - G l u - I l e - T r p - G l n - A l a - T y r - L e u (配列番号: 7) の合成

前記(1)と同様にして、Fmoc-L e u - A l k o R e s i n 100 mgを用いて、Fmoc-T y r (t B u) - O H , Fmoc-A l a - O H , Fmoc-G l n - O H , Fmoc-T r p (B o c) - O H , Fmoc-I l e - O H , Fmoc-G l u (O t B u) - O H , Fmoc-V a l - O H , F

m o c - T y r (t B u) - O H , F m o c - A s p (O t B u) - O H を順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0. 1 % T F A 水で平衡化させた逆相系充填剤 Y M C - P A C K O D S - A カラム (3 0 φ × 2 5 0 mm) に注入し、カラムを 0. 1 % T F A 水で洗浄後、アセトニトリル濃度を 1 8 0 分で 3 5 % まで増加させ、流速 7 m l / m i n. で溶出した。溶出液を A 2 2 0 n m でモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、A s p - T y r - V a l - G l u - I l e - T r p - G l n - A l a - T y r - L e u 1 8. 9 m g を得た。

【0087】

得られた A s p - T y r - V a l - G l u - I l e - T r p - G l n - A l a - T y r - L e u は、逆相系充填剤 Y M C - P A C K O D S - A M カラム (4. 6 φ × 2 5 0 mm) を用いた、2 5 % から 5 5 % までの 0. 1 % T F A を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間 2 0. 5 分を示し、そのアミノ酸分析値（ただし、T r p は検出せず）および質量分析値は理論値と一致した。

【0088】

アミノ酸分析

加水分解：1 % フエノール／6 N 塩酸水溶液、1 1 0 ℃、1 0 時間

分析法：ニンヒドリン法

* 基準アミノ酸 () 内理論値

A s x : 1. 00 (1)

G l x : 2. 09 (2)

A l a : 1. 04 (1)

V a l : 0. 89 (1)

I l e : 0. 86 (1)

* L e u : 1. 00 (1)

T y r : 1. 95 (2)

質量分析 (F A B)

[M+H]⁺ : 1300

【0089】

(6) SART-3 「426-434」 Asp-Tyr-Leu-Arg-Arg-Arg-Val-Asp-Phe (配列番号: 8) の合成

前記(1)と同様にして、Fmoc-Phe-Alko Resin (0.7 mmol/g, 100-200 mesh) 100mgを用いて、Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム(3.0φ×250mm)に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を240分で25%まで増加させ、流速7ml/min.で溶出した。溶出液を220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Asp-Tyr-Leu-Arg-Arg-Arg-Val-Asp-Phe 34.0mgを得た。

【0090】

得られたAsp-Tyr-Leu-Arg-Arg-Arg-Arg-Val-Asp-Pheは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6φ×250mm)を用いた、12%から42%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間20.1分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

【0091】

アミノ酸分析

加水分解: 1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、12時間

分析法: ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

Asx: 1.90 (2)

Val: 0.95 (1)

* L e u : 1. 00 (1)

T y r : 1. 00 (1)

P h e : 0. 99 (1)

A r g : 2. 93 (3)

質量分析 (F A B)

$[M+H]^+$: 1239

【0092】

(7) SART-3 「448-456」 A l a - P h e - T h r - A r g - A l a - L e u - G l u - T y r - L e u (配列番号: 9) の合成

前記(1)と同様にして、Fmoc-Leu-Alko Resin 100 mgを用いて、Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ala-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1%TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-PACK ODS-Aカラム(30φ×250mm)に注入し、カラムを0.1%TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を240分で30%まで増加させ、流速7ml/min.で溶出した。溶出液を220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、A l a - P h e - T h r - A r g - A l a - L e u - G l u - T y r - L e u 22.8mgを得た。

【0093】

得られたA l a - P h e - T h r - A r g - A l a - L e u - G l u - T y r - L e uは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AMカラム(4.6φ×250mm)を用いた、20%から50%までの0.1%TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間18.1分を示し、そのアミノ酸分析値および質量分析値は理論値と一致した。

【0094】

アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール／6N塩酸水溶液、110℃、12時間

分析法：ニンヒドリン法

*基準アミノ酸 () 内理論値

Thr : 0.91 (1)

Glx : 1.03 (1)

Ala : 1.91 (2)

*Leu : 2.00 (2)

Tyr : 1.00 (1)

Phe : 0.97 (1)

Arg : 0.97 (1)

質量分析 (FAB)

$[M + H]^+$: 1083

【0095】

実施例6

腫瘍抗原ペプチド及びその誘導体による末梢血リンパ球からのCTL誘導

実施例5で合成した「109-118」(配列番号: 3) 及び「315-323」(配列番号: 6) のペプチドを用いて、末梢血リンパ球から抗原特異的なCTLが誘導できるか検討した。

HLA-AローカスがA24のヘテロである健常人2名(それぞれHD1、HD2と表記する)の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離した。24穴プレートに 2×10^6 細胞/穴となるようにリンパ球を加え、リンパ球培養液で培養した。培養液に前記腫瘍抗原ペプチドを $10 \mu M$ になるように加え、末梢血リンパ球を刺激した。1週間後、X線照射(50Gy)した約 2×10^5 個の末梢血リンパ球とともに前記腫瘍抗原ペプチドを $10 \mu M$ になるように加えて、2回目の刺激を行った。さらに1週間後、3回目の刺激を同様に繰り返した。3回目の刺激から1週間後、培養したリンパ球を回収した。腫瘍抗原タンパク質を発現しておりHLA-A2402陽性のT細胞白血病細胞株であるMT-2、及び腫瘍抗原タンパク質を発現しているがHLA-A2402陰性のT細胞白血病細胞株であるRPMI18402をそれぞれ標的細

胞 (1×10^4 個) として、前記のリンパ球 (8×10^4 個) が反応して產生する培養上清中の IFN- γ 量を、実施例 1 と同様の E L I S A 法にて測定した。結果を表 6 に示す。

【0096】

【表 6】

抗原ペプチド	上清中の IFN- γ (pg/ml)			
	HD1 MT-2	HD1 RPMI18402	HD2 MT-2	HD2 RPMI18402
「109-118」	1771	159	2078	28
「315-323」	2041	26	974	40
なし	552	154	413	69

【0097】

「109-118」及び「315-323」のペプチドで刺激した末梢血リンパ球は、HLA-A2 4 陽性の MT-2 に反応したが、HLA-A24 陰性の RPMI18402 には反応しなかったことから、HLA-A24 拘束性の抗原ペプチド特異的な CTL が誘導されていることが示された。

なお本実験で用いた MT-2 の代わりに、HLA-A24 の cDNA 発現プラスミドを COS-7 細胞 (ATCC No. CRL1651) や VA-13 細胞 (理化学研究所細胞銀行) に導入してペプチドをパルスした細胞を用いることによっても、同様の実験を行うことが可能である (J. Exp. Med., 187:277, 1998)。

【0098】

配列表フリーテキスト

配列番号：25 に記載のアミノ酸配列の第 2 番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第 10 番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0099】

配列番号：26 に記載のアミノ酸配列の第 2 番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第 10 番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチ

オニンである。

【0100】

配列番号：27に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0101】

配列番号：28に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0102】

配列番号：29に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第10番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0103】

配列番号：30に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0104】

配列番号：31に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

【0105】

【発明の効果】

本発明により、新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タン

パク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドまたはこれらの誘導体を、*in vivo*または*in vitro*で利用した腫瘍の治療剤または予防剤などを提供することができる。

【0106】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ITOH, Kyogo; Sumitomo Pharmaceuticals Co.,Ltd.

<120> A Novel Tumor Antigen SART-3, and It's Tumor Antigen Peptides

<130> 132528

<160> 31

【0107】

<210> 1

<211> 963

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ala Ser Glu Pro Glu Ala Glu Ser

5

10

15

Lys Ala Gly Pro Lys Ala Asp Gly Glu Glu Asp Glu Val Lys Ala Ala

20

25

30

Arg Thr Arg Arg Lys Val Leu Ser Arg Ala Val Ala Ala Ala Thr Tyr

35

40

45

Lys Thr Met Gly Pro Ala Trp Asp Gln Gln Glu Glu Gly Val Ser Glu

50

55

60

Ser Asp Gly Asp Glu Tyr Ala Met Ala Ser Ser Ala Glu Ser Ser Pro

65

70

75

80

Gly Glu Tyr Glu Trp Glu Tyr Asp Glu Glu Glu Lys Asn Gln Leu

85	90	95
Glu Ile Glu Arg Leu Glu Glu Gln Leu Ser Ile Asn Val Tyr Asp Tyr		
100	105	110
Asn Cys His Val Asp Leu Ile Arg Leu Leu Arg Leu Glu Gly Glu Leu		
115	120	125
Thr Lys Val Arg Met Ala Arg Gln Lys Met Ser Glu Ile Phe Pro Leu		
130	135	140
Thr Glu Glu Leu Trp Leu Glu Trp Leu His Asp Glu Ile Ser Met Ala		
145	150	155
Gln Asp Gly Leu Asp Arg Glu His Val Tyr Asp Leu Phe Glu Lys Ala		
165	170	175
Val Lys Asp Tyr Ile Cys Pro Asn Ile Trp Leu Glu Tyr Gly Gln Tyr		
180	185	190
Ser Val Gly Gly Ile Gly Gln Lys Gly Gly Leu Glu Lys Val Arg Ser		
195	200	205
Val Phe Glu Arg Ala Leu Ser Ser Val Gly Leu His Met Thr Lys Gly		
210	215	220
Leu Ala Leu Trp Glu Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Ser Ala Ile Val Glu		
225	230	235
Ala Ala Arg Leu Glu Lys Val His Ser Leu Phe Arg Arg Gln Leu Ala		
245	250	255
Ile Pro Leu Tyr Asp Met Glu Ala Thr Phe Ala Glu Tyr Glu Glu Trp		
260	265	270
Ser Glu Asp Pro Ile Pro Glu Ser Val Ile Gln Asn Tyr Asn Lys Ala		
275	280	285
Leu Gln Gln Leu Glu Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gln		
290	295	300
Ala Glu Ala Pro Arg Leu Ala Glu Tyr Gln Ala Tyr Ile Asp Phe Glu		
305	310	315
320		

Met Lys Ile Gly Asp Pro Ala Arg Ile Gln Leu Ile Phe Glu Arg Ala
 325 330 335
 Leu Val Glu Asn Cys Leu Val Pro Asp Leu Trp Ile Arg Tyr Ser Gln
 340 345 350
 Tyr Leu Asp Arg Gln Leu Lys Val Lys Asp Leu Val Leu Ser Val His
 355 360 365
 Asn Arg Ala Ile Arg Asn Cys Pro Trp Thr Val Ala Leu Trp Ser Arg
 370 375 380
 Tyr Leu Leu Ala Met Glu Arg His Gly Val Asp His Gln Val Ile Ser
 385 390 395 400
 Val Thr Phe Glu Lys Ala Leu Asn Ala Gly Phe Ile Gln Ala Thr Asp
 405 410 415
 Tyr Val Glu Ile Trp Gln Ala Tyr Leu Asp Tyr Leu Arg Arg Arg Val
 420 425 430
 Asp Phe Lys Gln Asp Ser Ser Lys Glu Leu Glu Leu Arg Ala Ala
 435 440 445
 Phe Thr Arg Ala Leu Glu Tyr Leu Lys Gln Glu Val Glu Glu Arg Phe
 450 455 460
 Asn Glu Ser Gly Asp Pro Ser Cys Val Ile Met Gln Asn Trp Ala Arg
 465 470 475 480
 Ile Glu Ala Arg Leu Cys Asn Asn Met Gln Lys Ala Arg Glu Leu Trp
 485 490 495
 Asp Ser Ile Met Thr Arg Gly Asn Ala Lys Tyr Ala Asn Met Trp Leu
 500 505 510
 Glu Tyr Tyr Asn Leu Glu Arg Ala His Gly Asp Thr Gln His Cys Arg
 515 520 525
 Lys Ala Leu His Arg Ala Val Gln Cys Thr Ser Asp Tyr Pro Glu His
 530 535 540
 Val Cys Glu Val Leu Leu Thr Met Glu Arg Thr Glu Gly Ser Leu Glu

545	550	555	560
Asp Trp Asp Ile Ala Val Gln Lys Thr Glu Thr Arg Leu Ala Arg Val			
565	570	575	
Asn Glu Gln Arg Met Lys Ala Ala Glu Lys Glu Ala Ala Leu Val Gln			
580	585	590	
Gln Glu Glu Glu Lys Ala Glu Gln Arg Lys Arg Ala Arg Ala Glu Lys			
595	600	605	
Lys Ala Leu Lys Lys Lys Ile Arg Gly Pro Glu Lys Arg Gly			
610	615	620	
Ala Asp Glu Asp Asp Glu Lys Glu Trp Gly Asp Asp Glu Glu Gln			
625	630	635	640
Pro Ser Lys Arg Arg Val Glu Asn Ser Ile Pro Ala Ala Gly Glu			
645	650	655	
Thr Gln Asn Val Glu Val Ala Ala Gly Pro Ala Gly Lys Cys Ala Ala			
660	665	670	
Val Asp Val Glu Pro Pro Ser Lys Gln Lys Glu Lys Ala Ala Ser Leu			
675	680	685	
Lys Arg Asp Met Pro Lys Val Leu His Asp Ser Ser Lys Asp Ser Ile			
690	695	700	
Thr Val Phe Val Ser Asn Leu Pro Tyr Ser Met Gln Glu Pro Asp Thr			
705	710	715	720
Lys Leu Arg Pro Leu Phe Glu Ala Cys Gly Glu Val Val Gln Ile Arg			
725	730	735	
Pro Ile Phe Ser Asn Arg Gly Asp Phe Arg Gly Tyr Cys Tyr Val Glu			
740	745	750	
Phe Lys Glu Glu Lys Ser Ala Leu Gln Ala Leu Glu Met Asp Arg Lys			
755	760	765	
Ser Val Glu Gly Arg Pro Met Phe Val Ser Pro Cys Val Asp Lys Ser			
770	775	780	

Lys Asn Pro Asp Phe Lys Val Phe Arg Tyr Ser Thr Ser Leu Glu Lys
 785 790 795 800
 His Lys Leu Phe Ile Ser Gly Leu Pro Phe Ser Cys Thr Lys Glu Glu
 805 810 815
 Leu Glu Glu Ile Cys Lys Ala His Gly Thr Val Lys Asp Leu Arg Leu
 820 825 830
 Val Thr Asn Arg Ala Gly Lys Pro Lys Gly Leu Ala Tyr Val Glu Tyr
 835 840 845
 Glu Asn Glu Ser Gln Ala Ser Gln Ala Val Met Lys Met Asp Gly Met
 850 855 860
 Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Lys Val Ala Ile Ser Asn Pro Pro Gln
 865 870 875 880
 Arg Lys Val Pro Glu Lys Pro Glu Thr Arg Lys Ala Pro Gly Gly Pro
 885 890 895
 Met Leu Leu Pro Gln Thr Tyr Gly Ala Arg Gly Lys Gly Arg Thr Gln
 900 905 910
 Leu Ser Leu Leu Pro Arg Ala Leu Gln Arg Pro Ser Ala Ala Ala Pro
 915 920 925
 Gln Ala Glu Asn Gly Pro Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala Ala Pro Ala
 930 935 940
 Ala Thr Glu Ala Pro Lys Met Ser Asn Ala Asp Phe Ala Lys Leu Phe
 945 950 955 960
 Leu Arg Lys
 963
 [0108]

<210> 2

<211> 3798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ccacgcgtcc	g atg	gct gca	act gct	gcc gaa	acc tcg	gct tca	gaa ccc	gag	50
Met Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ala Ser Glu Pro Glu									
	5		10						
gct gag	tcc aag	gct ggg	ccc aag	gct gac	gga gag	gag gat	gag gtt		98
Ala Glu Ser Lys Ala Gly Pro Lys Ala Asp Gly Glu Glu Asp Glu Val									
	15		20		25				
aag	gct agg	aca agg	aga aag	gtg tta	tcg cgg	gct gtg	gcc gct		146
Lys Ala Ala Arg Thr Arg Arg Lys Val Leu Ser Arg Ala Val Ala Ala									
	30		35		40		45		
gct	aca tac	aag acc	atg ggg	cca gct	tgg gat	cag cag	gag gaa	ggc	194
Ala Thr Tyr Lys Thr Met Gly Pro Ala Trp Asp Gln Gln Glu Glu Gly									
	50		55		60				
gtg	agc gag	agc gat	ggg gat	gag tac	gcc atg	gct tcc	tcc gct	gag	242
Val Ser Glu Ser Asp Gly Asp Glu Tyr Ala Met Ala Ser Ser Ala Glu									
	65		70		75				
agc	tcc ccc	ggg gag	tac gag	tgg gaa	tat gac	gaa gag	gag gag	aaa	290
Ser Ser Pro Gly Glu Tyr Glu Trp Glu Tyr Asp Glu Glu Glu Lys									
	80		85		90				
aac	cag ctg	gag att	gag aga	ctg gag	gag cag	ttg tct	atc aac	gtc	338
Asn Gln Leu Glu Ile Glu Arg Leu Glu Glu Gln Leu Ser Ile Asn Val									
	95		100		105				
tat	gac tac	aac tgc	cat gtg	gac ttg	atc aga	ctg ctc	agg ctg	gaa	386
Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Ile Arg Leu Leu Arg Leu Glu									
	110		115		120		125		
ggg	gag ctt	acc aag	gtg agg	atg gcc	cgc cag	aag atg	agt gaa	atc	434
Gly Glu Leu Thr Lys Val Arg Met Ala Arg Gln Lys Met Ser Glu Ile									
	130		135		140				
ttt	ccc ttg	act gaa	gag ctc	tgg ctg	gag tgg	ctg cat	gac gag	atc	482

Phe Pro Leu Thr Glu Glu Leu Trp Leu Glu Trp Leu His Asp Glu Ile
 145 150 155
 agc atg gcc cag gat ggc ctg gac aga gag cac gtg tat gac ctc ttt 530
 Ser Met Ala Gln Asp Gly Leu Asp Arg Glu His Val Tyr Asp Leu Phe
 160 165 170
 gag aaa gcc gtg aag gat tac att tgt cct aac att tgg cta gag tat 578
 Glu Lys Ala Val Lys Asp Tyr Ile Cys Pro Asn Ile Trp Leu Glu Tyr
 175 180 185
 ggc cag tac tca gtt ggt ggg att ggt cag aaa ggt ggc ctt gag aaa 626
 Gly Gln Tyr Ser Val Gly Gly Ile Gly Gln Lys Gly Gly Leu Glu Lys
 190 195 200 205
 gtt cgc tcc gtg ttt gaa agg gct ctc tcg tct gtt ggt tta cat atg 674
 Val Arg Ser Val Phe Glu Arg Ala Leu Ser Ser Val Gly Leu His Met
 210 215 220
 acc aaa gga ctc gcc ctc tgg gag gct tac cga gag ttt gaa agt gcg 722
 Thr Lys Gly Leu Ala Leu Trp Glu Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Ser Ala
 225 230 235
 att gtg gaa gct gct cgg ctt gag aaa gtc cac agt ctt ttc cgg cga 770
 Ile Val Glu Ala Ala Arg Leu Glu Lys Val His Ser Leu Phe Arg Arg
 240 245 250
 cag ttg gcg atc cca ctc tat gat atg gag gcc aca ttt gca gag tat 818
 Gln Leu Ala Ile Pro Leu Tyr Asp Met Glu Ala Thr Phe Ala Glu Tyr
 255 260 265
 gaa gaa tgg tca gaa gac cca ata cca gag tca gta att cag aac tat 866
 Glu Glu Trp Ser Glu Asp Pro Ile Pro Glu Ser Val Ile Gln Asn Tyr
 270 275 280 285
 aac aaa gca cta cag cag ctg gag aaa tat aaa ccc tat gaa gaa gca 914
 Asn Lys Ala Leu Gln Gln Leu Glu Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Glu Ala
 290 295 300

ctg ttg cag gca gag gca cca agg ctg gca gaa tat caa gca tat atc 962
 Leu Leu Gln Ala Glu Ala Pro Arg Leu Ala Glu Tyr Gln Ala Tyr Ile
 305 310 315
 gat ttt gag atg aaa att ggc gat cct gct cgc att cag ttg atc ttt 1010
 Asp Phe Glu Met Lys Ile Gly Asp Pro Ala Arg Ile Gln Leu Ile Phe
 320 325 330
 gag cgc gcc ctg gtc gag aac tgc ctt gtc cca gac tta tgg atc cgt 1058
 Glu Arg Ala Leu Val Glu Asn Cys Leu Val Pro Asp Leu Trp Ile Arg
 335 340 345
 tac agt cag tac cta gat cga caa ctg aaa gta aag gat ttg gtt tta 1106
 Tyr Ser Gln Tyr Leu Asp Arg Gln Leu Lys Val Lys Asp Leu Val Leu
 350 355 360 365
 tct gta cat aac cgc gct att aga aac tgc ccc tgg aca gtt gcc tta 1154
 Ser Val His Asn Arg Ala Ile Arg Asn Cys Pro Trp Thr Val Ala Leu
 370 375 380
 tgg agt cgg tac ctc ttg gcc atg gag aga cat gga gtt gat cat caa 1202
 Trp Ser Arg Tyr Leu Leu Ala Met Glu Arg His Gly Val Asp His Gln
 385 390 395
 gta att tct gta acc ttc gag aaa gct ttg aat gcc ggc ttc atc cag 1250
 Val Ile Ser Val Thr Phe Glu Lys Ala Leu Asn Ala Gly Phe Ile Gln
 400 405 410
 gcc act gat tat gtg gag att tgg cag gca tac ctt gat tac ctg agg 1298
 Ala Thr Asp Tyr Val Glu Ile Trp Gln Ala Tyr Leu Asp Tyr Leu Arg
 415 420 425
 aga agg gtt gat ttc aaa caa gac tcc agt aaa gag ctg gag gag ttg 1346
 Arg Arg Val Asp Phe Lys Gln Asp Ser Ser Lys Glu Leu Glu Leu
 430 435 440 445
 agg gcc gcc ttt act cgt gcc ttg gag tat ctg aag cag gag gtg gaa 1394
 Arg Ala Ala Phe Thr Arg Ala Leu Glu Tyr Leu Lys Gln Glu Val Glu

450	455	460	
gag cgt ttc aat gag agt ggt gat cca agc tgc gtg att atg cag aac			1442
Glu Arg Phe Asn Glu Ser Gly Asp Pro Ser Cys Val Ile Met Gln Asn			
465	470	475	
tgg gct agg att gag gct cga ctg tgc aat aac atg cag aaa gct cgg			1490
Trp Ala Arg Ile Glu Ala Arg Leu Cys Asn Asn Met Gln Lys Ala Arg			
480	485	490	
gaa ctc tgg gat agc atc atg acc aga gga aat gcc aag tac gcc aac			1538
Glu Leu Trp Asp Ser Ile Met Thr Arg Gly Asn Ala Lys Tyr Ala Asn			
495	500	505	
atg tgg cta gag tat tac aac ctg gaa aga gct cat ggt gac acc cag			1586
Met Trp Leu Glu Tyr Tyr Asn Leu Glu Arg Ala His Gly Asp Thr Gln			
510	515	520	525
cac tgc cgg aag gct ctg cac cgg gcc gtc cag tgc acc agt gac tac			1634
His Cys Arg Lys Ala Leu His Arg Ala Val Gln Cys Thr Ser Asp Tyr			
530	535	540	
cca gag cac gtc tgc gaa gtg tta ctc acc atg gag agg aca gaa ggt			1682
Pro Glu His Val Cys Glu Val Leu Leu Thr Met Glu Arg Thr Glu Gly			
545	550	555	
tct tta gaa gat tgg gat ata gct gtt cag aaa act gaa acc cga tta			1730
Ser Leu Glu Asp Trp Asp Ile Ala Val Gln Lys Thr Glu Thr Arg Leu			
560	565	570	
gct cgt gtc aat gag cag aga atg aag gct gca gag aag gaa gca gcc			1778
Ala Arg Val Asn Glu Gln Arg Met Lys Ala Ala Glu Lys Glu Ala Ala			
575	580	585	
ctt gtg cag caa gaa gaa aag gct gaa caa cgg aaa aga gct cgg			1826
Leu Val Gln Gln Glu Glu Glu Lys Ala Glu Gln Arg Lys Arg Ala Arg			
590	595	600	605
gct gag aag aaa gcg tta aaa aag aag aaa aag atc aga ggc cca gag			1874

Ala Glu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Lys Lys Ile Arg Gly Pro Glu
 610 615 620
 aag cgc gga gca gat gag gac gat gag aaa gag tgg ggc gat gat gaa 1922
 Lys Arg Gly Ala Asp Glu Asp Asp Glu Lys Glu Trp Gly Asp Asp Glu
 625 630 635
 gaa gag cag cct tcc aaa cgc aga agg gtc gag aac agc atc cct gca 1970
 Glu Glu Gln Pro Ser Lys Arg Arg Val Glu Asn Ser Ile Pro Ala
 640 645 650
 gct gga gaa aca caa aat gta gaa gta gca gca ggg ccc gct ggg aaa 2018
 Ala Gly Glu Thr Gln Asn Val Glu Val Ala Ala Gly Pro Ala Gly Lys
 655 660 665
 tgt gct gcc gta gat gtg gag ccc cct tcg aag cag aag gag aag gca 2066
 Cys Ala Ala Val Asp Val Glu Pro Pro Ser Lys Gln Lys Glu Lys Ala
 670 675 680 685
 gcc tcc ctg aag agg gac atg ccc aag gtg ctg cac gac agc agc aag 2114
 Ala Ser Leu Lys Arg Asp Met Pro Lys Val Leu His Asp Ser Ser Lys
 690 695 700
 gac agc atc acc gtc ttt gtc agc aac ctg ccc tac agc atg cag gag 2162
 Asp Ser Ile Thr Val Phe Val Ser Asn Leu Pro Tyr Ser Met Gln Glu
 705 710 715
 ccg gac acg aag ctc agg cca ctc ttc gag gcc tgt ggg gag gtg gtc 2210
 Pro Asp Thr Lys Leu Arg Pro Leu Phe Glu Ala Cys Gly Glu Val Val
 720 725 730
 cag atc cga ccc atc ttc agc aac cgt ggg gat ttc cga ggt tac tgc 2258
 Gln Ile Arg Pro Ile Phe Ser Asn Arg Gly Asp Phe Arg Gly Tyr Cys
 735 740 745
 tac gtg gag ttt aaa gaa gag aaa tca gcc ctt cag gca ctg gag atg 2306
 Tyr Val Glu Phe Lys Glu Glu Lys Ser Ala Leu Gln Ala Leu Glu Met
 750 755 760 765

gac	cgg	aaa	agt	gta	gaa	ggg	agg	cca	atg	ttt	gtt	tcc	ccc	tgt	gtg	2354
Asp	Arg	Lys	Ser	Val	Glu	Gly	Arg	Pro	Met	Phe	Val	Ser	Pro	Cys	Val	
770															780	
gat	aag	agc	aaa	aac	ccc	gat	ttt	aag	gtg	ttc	agg	tac	agc	act	tcc	2402
Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Pro	Asp	Phe	Lys	Val	Phe	Arg	Tyr	Ser	Thr	Ser	
785															795	
cta	gag	aaa	cac	aag	ctg	ttc	atc	tca	ggc	ctg	cct	ttc	tcc	tgt	act	2450
Leu	Glu	Lys	His	Lys	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Leu	Pro	Phe	Ser	Cys	Thr	
800															810	
aaa	gag	gaa	cta	gaa	gaa	atc	tgt	aag	gct	cat	ggc	acc	gtg	aag	gac	2498
Lys	Glu	Glu	Leu	Glu	Ile	Cys	Lys	Ala	His	Gly	Thr	Val	Lys	Asp		
815															825	
ctc	agg	ctg	gtc	acc	aac	cgg	gct	ggc	aaa	cca	aag	ggc	ctg	gcc	tac	2546
Leu	Arg	Leu	Val	Thr	Asn	Arg	Ala	Gly	Lys	Pro	Lys	Gly	Leu	Ala	Tyr	
830															845	
gtg	gag	tat	gaa	aat	gaa	tcc	cag	gcg	tcg	cag	gct	gtg	atg	aag	atg	2594
Val	Glu	Tyr	Glu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Ser	Gln	Ala	Val	Met	Lys	Met	
850															860	
gac	ggc	atg	act	atc	aaa	gag	aac	atc	atc	aaa	gtg	gca	atc	agc	aac	2642
Asp	Gly	Met	Thr	Ile	Lys	Glu	Asn	Ile	Ile	Lys	Val	Ala	Ile	Ser	Asn	
865															875	
cct	cct	cag	agg	aaa	gtt	cca	gag	aag	cca	gag	acc	agg	aag	gca	cca	2690
Pro	Pro	Gln	Arg	Lys	Val	Pro	Glu	Lys	Pro	Glu	Thr	Arg	Lys	Ala	Pro	
880															890	
ggt	ggc	ccc	atg	ctt	ttg	ccg	cag	aca	tac	gga	gcg	agg	ggg	aag	gga	2738
Gly	Gly	Pro	Met	Leu	Leu	Pro	Gln	Thr	Tyr	Gly	Ala	Arg	Gly	Lys	Gly	
895															905	
agg	acg	cag	ctg	tct	cta	ctg	cct	cgt	gcc	ctg	cag	cgc	cca	agt	gct	2786
Arg	Thr	Gln	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu	Gln	Arg	Pro	Ser	Ala	

910	915	920	925	
gca gct cct cag gct gag aac ggc cct gcc gcg gct cct gca gtt gcc				2834
Ala Ala Pro Gln Ala Glu Asn Gly Pro Ala Ala Ala Pro Ala Val Ala				
930	935	940		
gcc cca gca gcc acc gag gca ccc aag atg tcc aat gcc gat ttt gcc				2882
Ala Pro Ala Ala Thr Glu Ala Pro Lys Met Ser Asn Ala Asp Phe Ala				
945	950	955		
aag ctg ttt ctg aga aag tgaacgggac gctggagac aggaaatgcc				2930
Lys Leu Phe Leu Arg Lys				
960				
ttacttcact ctggcccggc ggacctccca ccacccagca gtgcactggg gatggacagg				2990
cctggtgtgc tgcgtgctcg caaccacaga tggctcctcg gctttagaca gaaagggaa				3050
ggggttctaa gtcaagagcc tttcagtgct ccctcatatt gagggcagtg gcagaaaaagt				3110
gaccactctg caggctggc ccaggatgtg gtgtcctgag atagtttgt atcttaaga				3170
ctgaggcaca gaagcgaaac gagaacacac tgtttttag acacagttgt ccaaatgtt				3230
ctggccagct ccggccccc ttgttatgac acttctcttc caccctgcac agcacatgt				3290
cccgtcattc tttaatttt aaaagatgaa atggcagatg ctagtaattc acagaatggc				3350
ctcttggtgg ggtgggtctg aggaaagtca gctataaaac atttgctgga gttttttca				3410
atggggctgt gcatttttat attatgttt tgtaaatgac atgtcagccc ttgtttcatg				3470
tttcctaaaa gcagaatatt tgcaacattt gttttgtata ggaatttattt gtgccacctg				3530
ctgtggactg tttctttgc ctagtgacta gtgacccgtg ttgtctaaac atagatttca				3590
gcccttttgtt ttgtttat accatgtcaa atgcaaactt caattctccc catttagctt				3650
tattaaactg acgttctctt caaaacttct tgctgaatgg tactcagatg tgcattcaca				3710
tacagatgtg tttgaagtg ggtgtacctt gctttaccta atagatgtgt aaatagaact				3770
tttgaagtc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa				3798

[0109]

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Tyr Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu

5

10

【0110】

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Leu Phe Glu Lys Ala Val Lys Asp Tyr Ile

5

10

【0111】

<210> 5

<211> 9.

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Tyr Asn Lys Ala Leu Gln Gln Leu

5

【0112】

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Tyr Ile Asp Phe Glu Met Lys Ile

5

【0113】

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Tyr Val Glu Ile Trp Gln Ala Tyr Leu

5

10

[0114]

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Tyr Leu Arg Arg Arg Val Asp Phe

5

[0115]

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Phe Thr Arg Ala Leu Glu Tyr Leu

5

[0116]

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Leu Ile

5

【0117】

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ile Phe Pro Leu Thr Glu Glu Leu Trp Leu

5

10

【0118】

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Tyr Ile Cys Pro Asn Ile Trp Leu

5

【0119】

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Tyr Gly Gln Tyr Ser Val Gly Gly Ile

5

10

【0120】

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Ser Ala Ile

5

【0121】

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Leu Phe Arg Arg Gln Leu Ala Ile Pro Leu

5

10

【0122】

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Tyr Glu Glu Trp Ser Glu Asp Pro Ile

5

10

【0123】

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Glu Ala Leu

5

【0124】

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Arg Tyr Ser Gln Tyr Leu Asp Arg Gln Leu

5

10

【0125】

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Phe Glu Lys Ala Leu Asn Ala Gly Phe

5

10

【0126】

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Asp Phe Lys Gln Asp Ser Ser Lys Glu Leu

5

10

【0127】

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Tyr Pro Glu His Val Cys Glu Val Leu

5

10

【0128】

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Phe Arg Gly Tyr Cys Tyr Val Glu Phe

5

10

【0129】

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Phe Lys Glu Glu Lys Ser Ala Leu

5

【0130】

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Phe Ser Cys Thr Lys Glu Glu Leu

5

【0131】

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 25

Val Xaa Asp Tyr Asn Cys His Val Asp Xaa

5

10

【0132】

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 26

Leu Xaa Glu Lys Ala Val Lys Asp Tyr Xaa

5

10

[0133]

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 27

Asn Xaa Asn Lys Ala Leu Gln Gln Xaa

5

[0134]

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 28

Ala Xaa Ile Asp Phe Glu Met Lys Xaa

5

【0135】

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 29

Asp Xaa Val Glu Ile Trp Gln Ala Tyr Xaa

5

10

【0136】

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 30

Asp Xaa Leu Arg Arg Arg Val Asp Xaa

5

[0137]

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 31

Ala Xaa Thr Arg Ala Leu Glu Tyr Xaa

5

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な腫瘍抗原タンパク質及びその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれらを *in vivo* または *in vitro* で利用した腫瘍の治療剤または予防剤を提供する。

【解決手段】 新規な腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド、これらの物質の誘導体、あるいはこれら腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、腫瘍抗原ペプチドまたはこれらの誘導体を、*in vivo* または *in vitro* で利用した腫瘍の治療剤または予防剤。

【選択図】 なし

【書類名】 職權訂正データ
【訂正書類】 特許願

〈認定情報・付加情報〉

【提出日】 平成10年 8月28日

【特許出願人】

【識別番号】 596094371

【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9

【氏名又は名称】 伊東 恭悟

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100107629

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番9.8号 住

友製菓株式会社

【氏名又は名称】

出願人履歴情報

識別番号 [596094371]

1. 変更年月日 1996年 6月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9
氏 名 伊東 恭悟

出願人履歴情報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名 住友製薬株式会社